

**VARIASI GENETIK *Oncomelania hupensis lindoensis* DENGAN METODE
RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA POLYMERASE CHAIN
REACTION (RAPD-PCR)
DI SULAWESI TENGAH TAHUN 2011**

Gunawan*, Anis Nurwidayati*, Nelfita* dan Brian Janitra*

*Balai Litbang P2B2 Donggala, Sulawesi Tengah, Indonesia
email : r.gunawand@gmail.com

**VARIATION GENETIC OF *O. h. lindoensis* USING RANDOM AMPLIFIED
POLYMORPHIC DNA POLYMERASE CHAIN REACTION (RAPD-PCR)
METHOD IN CENTRAL OF SULAWESI**

Abstract

Schistosomiasis is a parasitic zoonotic disease caused by Schistosoma japonicum. In Indonesia, S. japonicum is only found in three endemic areas in the highlands of Central Sulawesi in Lindu valley, Napu and Bada with the snail Oncomelania hupensis lindoensis as intermediate host. The aim of the study was to examine variation genetic of Oncomelania hupensis lindoensis using RAPD PCR. The research divided into two phases which were field research for collecting Oncomelania hupensis lindoensis as samples and laboratory research, consisted of DNA isolation, quantification DNA, dilution DNA, RAPD PCR, electrophoresis and visualisation electrophoresis. Variation genetic of O.h.lindoensis from the schistosomiasis endemic areas was in the form of polymorphism levels, which were respectively 54.55%, 50%, 45.45%, 22.22%, 16.67%, and 14.29%. The results of this research showed a difference in genetic variation in the form of polymorphism of Oncomelania hupensis lindoensis from Lindu, Napu, Bada, highlands.

Keywords : O.h.lindoensis, RAPD PCR, polymorfisme

Abstrak

Schistosomiasis adalah penyakit parasitik yang bersifat zoonosis. Di Indonesia schistosomiasis disebabkan oleh Schistosoma japonicum dan hanya ditemukan di tiga daerah endemik di Sulawesi Tengah (dataran tinggi Lindu, Napu dan Bada) dengan hospes perantara keong Oncomelania hupensis lindoensis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya variasi genetik O.h.lindoensis dengan menggunakan Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR).

Penelitian ini terdiri dari dua fase, meliputi penelitian dilapangan yaitu pengambilan sampel keong O.h.lindoensis dan penelitian dilaboratorium yaitu isolasi DNA, kuantifikasi DNA, dilusi DNA, RAPD-PCR, Elektroforesis dan visualisasi hasil elektroforesis.

Variasi genetik O.h.lindoensis dari ketiga daerah adalah dalam bentuk tingkat polimorfisme, yaitu berturut-turut adalah 54,55 %, 50 %, 45,45 %, 22,22 %, 16,67 %, dan 14,29 %. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan variasi genetik O.h.lindoensis dalam bentuk polimorfisme yang berasal dari dataran tinggi Lindu, Napu dan Bada.

Kata kunci: O.h.lindoensis, RAPD PCR, polimorfisme

PENDAHULUAN

Schistosomiasis di Indonesia ditemukan oleh Muller dan Tesch pada tahun 1935. Penyakit ini disebabkan oleh cacing *Schistosoma japonicum* dan hanya ditemukan endemik di tiga daerah di Sulawesi Tengah yaitu di dataran tinggi lembah Lindu, Napu dan Bada dengan hospes perantaranya yaitu keong *Oncomelania hupensis lindoensis*^{2,3,4,5}.

Selain menginfeksi manusia juga menginfeksi hewan mamalia lainnya. Ada 13 mamalia yang dapat terinfeksi oleh schistosomiasis antara lain sapi (*Bos sundaicus*), kerbau (*Bubalus bubalis*), kuda (*Equus caballus*), anjing (*Canis familiaris*), babi (*Sus sp*), musang (*Viverra zibetha*), rusa (*Carvus timorensis*), dan berbagai jenis tikus (*Rattus exulans*, *R. marmosurus*, *R. norvegicus*, *R. palallae*).²

Penelitian yang intensif akhirnya menemukan bahwa keong *O. h. lindoensis* bersifat *amfibius*, dimana keong tersebut menyukai tempat yang becek, lembab dan berair, akan tetapi keong ini akan mati apabila terendam air. Demikian juga sebaliknya, keong ini akan mati apabila tidak mendapatkan air^{4,6}. Kelemahan keong tersebut dimanfaatkan untuk program pemberantasan dengan memutuskan rantai penularan di daerah endemik schistosomiasis. Keong *O.h lindoensis* termasuk dalam kelas Gastropoda dan famili Pomatiopsidae^{6,7,8}.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik yang dikembangkan oleh Kathy Mullis tahun 1985 yang efektif untuk memperbanyak DNA secara *in vitro*^{9,10}. Teknik ini memungkinkan dihasilkannya berjuta-juta copy dari suatu fragmen DNA tertentu. Beberapa marker molekuler yang berbasis PCR salah satunya adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) yang dikembangkan pertama kali oleh Williams et al. (1990) dan banyak dimanfaatkan untuk menguji tingkat polimorfisme DNA¹⁰. Metode RAPD-PCR menggunakan primer tunggal rantai pendek dengan oligonukleida yang berukuran 10-12 basa untuk mengamplifikasi fragmen DNA secara acak tanpa mengetahui urutan nukleotida atau DNA target yang spesifik.

Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi.

Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya, seperti *Restricted Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Degradative Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) dan *Macrorestricted Fragment Length Polymorphism* (MFLP). Teknik ini mampu menghasilkan jumlah karakter yang relatif tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya¹⁰. Di China (Zhao, 2010) telah dilakukan penelitian perbedaan genetik *Oncomelania hupensis* dengan metode *Internal Transcribed Spacer* 1 dan 2 (ITS 1 dan 2). Kemudian menurut penelitian yang dilakukan oleh Osama (2011) menunjukkan bahwa ada perbedaan variasi genetik dalam bentuk polimorfisme antara *Biomphalaria* spp sebagai hospes perantara schistosomiasis yang berasal dari Arab dan Mesir. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang variasi genetik keong *O.h. lindoensis* sebagai hospes perantara schistosomiasis di Indonesia karena belum pernah dilakukan dengan menggunakan metode RAPD-PCR.

Pada penelitian ini akan dilakukan analisis genetik *O.h lindoensis* dengan menggunakan Metode RAPD-PCR. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui adanya variasi genetik *O.h.lindoensis* yang berasal dari dataran tinggi Lindu, Napu dan Bada (Sulawesi Tengah) dengan menggunakan metode *Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR). Manfaat dari penelitian ini akan diperoleh informasi mengenai variasi genetik dan karakteristik *O. h lindoensis* yang berasal dari dataran tinggi Bada, Napu dan Lindu (Sulawesi Tengah). Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu dalam membuat strategi pengendalian penyakit schistosomiasis menjadi lebih efektif dan efisien khususnya terhadap *O.h.lindoensis* dan dapat dijadikan sebagai data dasar untuk melakukan penelitian lanjutan.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan keong *O.h. lindoensis*

Keong dikoleksi dengan menggunakan metode *ing* (gelang besi) yaitu gelang besi dilemparkan di habitat keong kemudian semua

keong yang berada didalam *ring* dikoleksi⁸. Pengambilan keong *O. h lindoensis* berasal dari dataran tinggi Bada, Napu dan Lindu (Sulawesi Tengah).

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan protokol atau prosedur kerja *PureLink™ Genomic DNA Mini Kits*. Sampel DNA hasil isolasi kemudian disimpan pada suhu -4°C untuk dilakukan pengujian selanjutnya.

Random Amplified Polymorphism DNA - Polymerase Chain Reaction (RAPD - PCR)

Analisis RAPD dilakukan dengan menggunakan produk dari Ready-To-Go RAPD Analysis Kit GE Healthcare Limited, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire. Komponen dari kit ini adalah terdiri dari Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (buffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA, AmpliTaq™ and Stoffel fragmen), kontrol *E. Coli* BL21 (DE3) DNA, kontrol *E. Coli* (C1a) DNA dan RAPD Primer Set. Primer yang dipakai dalam penelitian ini adalah primer yang terdapat dalam kit RAPD (dapat dilihat pada Tabel 1). Sedangkan pada penelitian ini volume standar yang digunakan untuk satu reaksi adalah 25 µl (Tabel 2). Untuk program siklus termal adalah : aktivasi awal pada 95°C selama 15 menit diikuti dengan 40 siklus yang terdiri dari 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 36°C dan 2

menit pada 72°C. Selanjutnya diikuti dengan 1 siklus pemanjangan final pada 72°C selama 10 menit.

Tabel 1. Primer yang digunakan dan urutan basa primer

| Nama Primer | Urutan basa (5'-3') |
|---------------|-----------------------|
| RAPD Primer 1 | (5'-d[GGTGCGGGAA]-3') |
| RAPD Primer 2 | (5'-d[GTTCGCTCC]-3') |
| RAPD Primer 3 | (5'-d[GTAGACCCGT]-3') |
| RAPD Primer 4 | (5'-d[AAGAGCCCGT]-3') |
| RAPD Primer 5 | (5'-d[AACGCGCAAC]-3') |
| RAPD Primer 6 | (5'-d[CCCGTCAGCA]-3') |

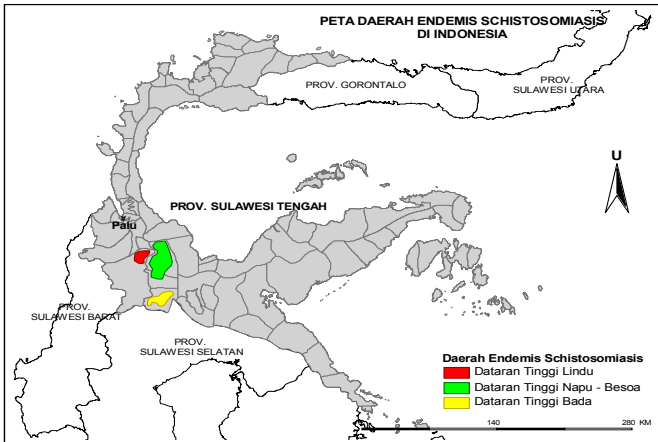
Tabel 2. Komposisi untuk RAPD PCR

| No | Nama Bahan | 1 x Reaksi |
|----|------------------------------------|------------|
| 1 | 25 pmol RAPD Primer | 5 µl |
| 2 | 5-50 ng DNA | 6,6 µl |
| 3 | Destilled Water (H ₂ O) | 13,4 µl |
| | Total Volume | 25 µl |

HASIL

Gambaran Umum Lokasi Penelitian

Secara administrasi wilayah Dataran Tinggi Lindu terletak di Kabupaten Sigi, Dataran Tinggi Napu masuk di wilayah Kecamatan Lore Utara, Lore Timur, Lore Peore, dan Lore Tengah, Kabupaten Poso dan Dataran Tinggi Bada yang secara administrasi terdapat di wilayah Kecamatan Lore Selatan dan Lore Barat, Kabupaten Poso.



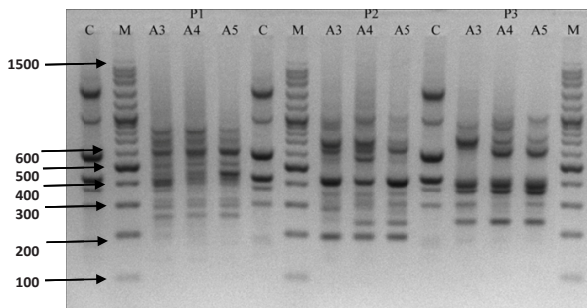
Sumber : Laporan Penelitian oleh Jastal, dkk³
Gambar 1. Peta Daerah Endemis Schistosomiasis di Indonesia (Sulawesi Tengah)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

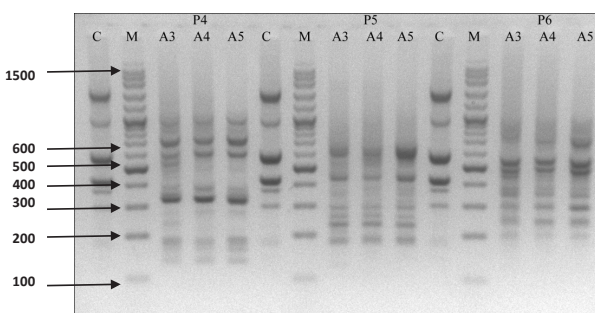
Berdasarkan hasil interpretasi pita DNA yang diamplifikasi dengan 6 primer RAPD didapatkan perbedaan dan persamaan pola pita-pita DNA *O.h.lindoensis*. Hasil RAPD-PCR dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.

Keragaman *O.h.lindoensis* dengan RAPD Primer 1

Berdasarkan hasil interpretasi pita DNA yang diamplifikasi dengan primer 1 menunjukkan hasil amplifikasi didapatkan 12 pita DNA yang berukuran antara 280-800 bp. Hasil analisis software POPGENE ver 3.2 didapatkan hasil bahwa untuk primer 1 tingkat polimorfisme nya adalah 16,67 %.



Gambar 2. Elektroforesis hasil RAPD - PCR sampel Keong *O.h.lindoensis* ; P 1 : Primer 1, P2 : Primer 2, P3 : Primer 3, C : Kontrol, M : Marker, A3 : *O.h.lindoensis* dari Dataran Tinggi Napu, A4 : *O.h.lindoensis* dari Dataran Tinggi Bada dan A5 : *O.h.lindoensis* dari Dataran Tinggi Lindu.



Gambar 3. Elektroforesis hasil RAPD - PCR sampel Keong *O.h.lindoensis*; P4: Primer 4, P5 : Primer 5, P6: Primer 6, C : Kontrol, M : Marker, A3 : *O.h.lindoensis* dari Dataran Tinggi Napu, A4: *O.h.lindoensis* dari Dataran Tinggi Bada dan A5 : *O.h.lindoensis* dari Dataran Tinggi Lindu.

Keragaman *O.h.lindoensis* dengan RAPD Primer 2

Hasil amplifikasi penggunaan primer 2 dapat dilihat bahwa pita hasil amplifikasi didapat 11 pita DNA yang berukuran berkisar antar 200-1000 bp. Analisis software POPGENE ver 3.2 didapatkan hasil bahwa untuk primer 2 tingkat polimorfisme nya adalah 45,45 %.

Keragaman *O.h.lindoensis* dengan RAPD Primer 3

Dari hasil amplifikasi dengan primer 3 dapat dilihat bahwa pita hasil amplifikasi didapat 8 pita DNA yang berukuran berkisar antar 250-1000 bp. Kemudian dianalisis dengan software POPGENE ver 3.2 didapatkan hasil bahwa untuk primer 3 tingkat polimorfisme nya adalah 50 %.

Keragaman *O.h.lindoensis* dengan RAPD Primer 4

Hasil interpretasi pita DNA yang diamplifikasi dengan primer 4 didapat 11 pita DNA berukuran antar 150-1000 bp. Data tersebut dianalisis dengan software POPGENE ver 3.2 didapatkan hasil bahwa untuk primer 4 tingkat polimorfisme nya adalah 54,55%

Keragaman *O.h.lindoensis* dengan RAPD Primer 5

Dari hasil amplifikasi dengan primer 5 dapat dilihat bahwa pita hasil amplifikasi didapat 7 pita DNA yang berukuran berkisar antar 250-1000 bp. Berdasarkan analisis software POPGENE ver 3.2 didapatkan hasil bahwa untuk primer 5 persentase polimorfismenya adalah 14,29 %.

Keragaman *O.h.lindoensis* dengan RAPD Primer 6

Primer 6 mengamplifikasi 9 pita DNA yang berukuran 200-1000 bp. Berdasarkan analisis software POPGENE ver 3.2 didapatkan hasil bahwa untuk primer 6 persentase polimorfisme nya adalah 22,22 %.

PEMBAHASAN

Schistosomiasis di Indonesia disebabkan oleh cacing *Schistosoma japonicum* dan hanya

ditemukan endemik di tiga daerah di Sulawesi Tengah yaitu di dataran tinggi lembah Lindu, Napu dan Bada dengan hospes perantaranya yaitu keong *Oncomelania hupensis lindoensis*^{2,3,4,5}.

Dalam penelitian ini *O. h. lindoensis* yang digunakan berasal dari tiga daerah endemis Schistosomiasis di Sulawesi Tengah yaitu dari dataran tinggi Napu, Bada dan Lindu (Sulawesi Tengah). Untuk primer yang dipakai dalam penelitian ini adalah primer yang terdapat dalam kit RAPD (dapat dilihat pada Tabel 1). Sedangkan pada penelitian ini volume standar yang digunakan untuk satu reaksi adalah 25 µl (Tabel 2). Untuk program siklus termal adalah : aktivasi awal pada 95°C selama 15 menit diikuti dengan 40 siklus yang terdiri dari 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 36°C dan 2 menit pada 72°C. Selanjutnya diikuti dengan 1 siklus pemanjangan final pada 72°C selama 10 menit.

Berdasarkan hasil penelitian dengan primer set yang berjumlah 6 berhasil di amplifikasi DNA *O. h. lindoensis* dengan metode RAPD-PCR. Hasil ini menunjukkan bahwa *O. h. lindoensis* yang berasal dari dataran tinggi Napu, dataran tinggi Bada dan dataran tinggi Lindu terdapat perbedaan variasi genetik keong *O.h.lindoensis* dengan tingkat polimorfisme yang berbeda, yaitu secara berturut-turut adalah 16,67 %, 45,45 %, 50 %, 54,55 %, 14,29 % dan 22,22 %.

Dari data hasil interpretasi pita DNA yang di amplifikasi dengan 6 primer dapat dijelaskan bahwa primer 1 menunjukkan hasil amplifikasi 12 pita DNA yang berukuran 280-800 bp (Tabel 3). Terdapat sepuluh pita spesifik atau yang sama untuk semua lokasi, yaitu pita yang berukuran 280 bp, 300 bp, 320 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp, 600 bp, 680 bp, 700 bp, dan 800 bp. Kemudian Hasil amplifikasi penggunaan primer 2 (Tabel 4) dapat dilihat bahwa pita hasil amplifikasi didapatkan 11 pita DNA yang berukuran 200-1000 bp. Hasil amplifikasi ini menunjukkan adanya lima pita spesifik atau yang sama untuk seluruh lokasi yaitu 300 bp, 380 bp, 400 bp, 650 bp, dan 1000 bp. Hasil amplifikasi dengan primer 3 dapat dilihat (Tabel 5) bahwa pita hasil amplifikasi didapat 8 pita DNA yang berukuran berkisar antar 250-1000 bp. Hasil amplifikasi ini menunjukkan adanya empat pita spesifik atau yang sama untuk seluruh lokasi yaitu 250 bp, 380 bp, 400 bp, dan 700 bp. Adanya

pita yang spesifik yang ditemukan pada hasil amplifikasi menggunakan primer 1, 2 dan 3 ini menunjukkan adanya perbedaan variasi genetik *O.h.lindoensis*.

Hasil interpretasi pita DNA yang di amplifikasi dengan primer 4 menunjukkan bahwa pita hasil amplifikasi didapat 11 pita DNA berukuran 150-1000 bp (Tabel 6). Pada seluruh sampel ditemukan delapan pita spesifik (unik) untuk semua lokasi, yaitu pita yang berukuran 150 bp, 200 bp, 250 bp, 400 bp, 520 bp, 700 bp, 900 bp, dan 1000 bp. Dari hasil amplifikasi dengan primer 5 dapat dilihat (Tabel 7) pita hasil amplifikasi didapat 7 pita DNA yang berukuran berkisar antar 250-1000 bp. Hasil amplifikasi ini menunjukkan adanya enam pita spesifik atau yang sama untuk seluruh lokasi yaitu 180 bp, 220 bp, 300 bp, 350 bp, 450 bp dan 600 bp. Dengan penggunaan primer 6 (Tabel 8) dapat dilihat bahwa ukuran pita DNA yang teramplifikasi berkisar antar 200-1000 bp. Hasil amplifikasi ini menunjukkan adanya lima pita spesifik atau yang sama untuk seluruh lokasi yaitu 300 bp, 380 bp, 400 bp, 650 bp, dan 1000 bp. Hal ini dapat dikatakan bahwa terjadi adanya perbedaan variasi genetik.

Perbedaan ini disebabkan karena dari ketiga lokasi tersebut dilihat dari letak geografisnya sangat berbeda. Secara topografi Dataran Tinggi Lindu terletak pada ketinggian 1.000 meter dpl, pada koordinat 01° 19' 39" LS dan 120° 02' 54" BT dan Dataran Tinggi Napu – Besoa merupakan suatu daerah dengan topografi berbukit-bukit dan berlembah, dataran tinggi ini terletak pada koordinat 01° 26' 23" LS dan 120° 20' 09" BT dan Dataran Tinggi Bada merupakan suatu daerah dengan topografi berbukit dan berlembah yang terletak pada koordinat 01° 51' 21" LS dan 120° 13' 40" BT⁵. Dari ketiga tempat pengambilan sampel tersebut dataran tinggi napu dan bada terletak dalam satu kabupaten, sedangkan dataran tinggi lindu terletak di kabupaten yang berbeda.

Pada umumnya semakin tinggi tingkat keanekaragaman genetik suatu organisme, semakin tinggi pula kemampuan organisme untuk dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungannya, dan lokasi geografis juga dapat mempengaruhi tingkat keanekaragaman suatu organisme¹². Sedangkan menurut penelitian yang

telah dilakukan oleh Osama (2011) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan variasi genetik antara keong *Biomphalaria* spp dengan metode RAPD-PCR sebagai hospes perantara schistosomiasis yang berasal dari Arab dan Mesir dalam bentuk polimorfisme. Selain itu ada kesamaan antara primer 1 yang digunakan dalam penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh Osama yaitu primer 1 mengamplifikasi 12 pita DNA. Penggunaan teknik RAPD dalam penelitian ini karena RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi. Teknik RAPD juga memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relatif tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya⁶.

Dengan diketahuinya terjadi perbedaan variasi genetik *O.h.lindoensis* yang berasal dari dataran tinggi Lindu, Napu dan Bada dapat dijadikan data dasar untuk dilakukan penelitian lanjutan dalam hal ini untuk sequencing DNA dari sampel tersebut.

KESIMPULAN

1. Terdapat variasi genetik keong *O.h.lindoensis* yang berasal dari dataran tinggi Napu, dataran tinggi Bada dan dataran tinggi Lindu dalam bentuk polimorfisme.
2. Faktor geografis sangat berpengaruh terhadap tingkat polimorfisme DNA *O.h.lindoensis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterimakasih kepada Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala Bapak Jastal, SKM, M.Si, kepada Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Poso dan kepada Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Sigi.

DAFTAR RUJUKAN

1. Anonim. Schistosomiasis. World Health Organization. Geneva.2013. Diakses 28 September 2013.
2. Sudomo, M. Penyakit Parasitik Yang Kurang Diperhatikan. Orasi Pengukuhan Profesor Riset

- Bidang Entomologi dan Moluska. Badan Litbang Kesehatan. Jakarta
3. Sudomo, M. Schistosomiasis control in Indonesia. Majalah Parasitologi Indonesia 13 (1-2): 1-10. 2000.
4. Sudomo, M. Some aspects of schistosome transmission in Central Sulawesi, Indonesia. Doctorate Disertation. Bandung Institute of Technology. 1980
5. Jastal, Mujiyanto, Garjito, T.A., Anastasia, H., Chadijah, S., Nurjana, M.A., Nurwidayati, A., et al. Analisis Spasial Epidemiologi Schistosomiasis dengan Menggunakan Penginderaan Jauh dan Sistem Informasi Geografis di Sulawesi Tengah. 2008. Balai Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Donggala, Laporan Penelitian.
6. Campbell, N.A. Biology, Fourth Edition, New York : Benjamin Cummings, pp 600 - 601 1996. <http://science.northern.edu/biology/genbio/images/trematoda.html>. [4 November 2004]
7. Hadidjaja, P dan M. Sudomo. Some aspect on the ecology and Biology of *O.h. lindoensis*. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth., 7(2).1976.
8. Hadidjaja, P. Schistosomiasis di Sulawesi Tengah Indonesia. Balai Penerbitan FKUI, Jakarta. 1985
9. Jan A. Rozendaal. Vector Control : Methods for use by individuals and communities. World Health Organization. Geneva, pp338 – 356. 1997.
10. Barlet, J, M, S and Stirling, D. Methods in Molecular Biology, vol. 226 : PCR Protocols, Second Edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ.1993.
11. Sudjadi. Bioteknologi Kesehatan. Kanisius, pp 91 – 147, 2007
12. Qin Ping Zhao, Meng Sin Jiang, D. Timothy J. Littlewood, Pin Nie, et. all. Distinct Genetic Diversity of *Oncomelania hupensis*, Intermediate Host of *Schistosoma japonicum* in Mainland China as Revealed by ITS Sequences. PloS Negl Trop Dis 4(3). Doi:10.1371/journal/pntd.0000611.2009.
13. Mostafa, O.M.S., dan Shadia M. El-Dafrawy. 2011. Susceptibility of *Biomphalaria* spp. To infection with *Schistosoma mansoni* in sympatric and allopatric combinations with observations on the generic variability between snails. J. Veterinary Parasitology. 180. pp 226-231.